

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：34509

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07005

研究課題名（和文）iPS細胞由来腸管細胞によるバイオ医薬及び高機能DDSの経口吸収性予測精度の検証

研究課題名（英文）Investigation of prediction of oral absorption of biopharmaceuticals and high-functional DDS using iPS cell-derived intestinal cells

研究代表者

武田 真莉子（Takeda, Mariko）

神戸学院大学・薬学部・教授

研究者番号：70257096

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ペプチド薬物の腸管吸収を予測する新たな*in vitro*モデル構築のために、小腸に近い性質を持つヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞（hiPSC-SIEC）の有用性を評価した。実験の結果、hiPSC-SIEC単層膜は、Caco-2細胞単層膜よりもペプチド薬物の輸送が著明に速いこと、またhiPSC-SIECのバリア機能の維持には二価の陽イオンが必要であること、さらにCaco-2細胞で確立された吸収促進剤適用実験条件はhiPSC-SIECsに適用できないこと等が明らかとなった。hiPSC-SIECを用いた*in vitro*評価モデルの構築にはこのような特性を十分に理解する必要があると結論される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高機能性DDSキャリアやバイオ薬物の経口吸収予測に使えるツールとして、近年、小腸に近い性質を持つヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞（hiPSC-SIEC）が開発され、腸管薬物透過性の*in vitro*評価における新規候補モデルとして注目されている。しかし、本研究の成果により、hiPSC-SIECの特性は、従来モデルであるCaco-2細胞とは大きく異なることが見出され、またCaco-2細胞で確立された実験法を適用できないことも明らかになったため、hiPSC-SIECを用いた*in vitro*評価モデルの構築のためにはその特性をさらに明らかにし、ツールとしての性能を上げる必要があると結論される。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to evaluate the utility of human iPS cell-derived small intestinal epithelial cells (hiPSC-SIECs), which have properties similar to those of the small intestine, for the construction of a new *in vitro* model to predict intestinal absorption of peptide drugs. Experimental results showed that the transport of peptide drugs was significantly faster in hiPSC-SIEC monolayers than in Caco-2 cell monolayers, that hiPSC-SIECs require divalent cations to maintain the barrier function, and that the experimental conditions established with Caco-2 cells for the application of absorption enhancers were not applicable to hiPSC-SIECs. It is concluded that these characteristics must be fully understood in order to construct an *in vitro* evaluation model using hiPSC-SIECs.

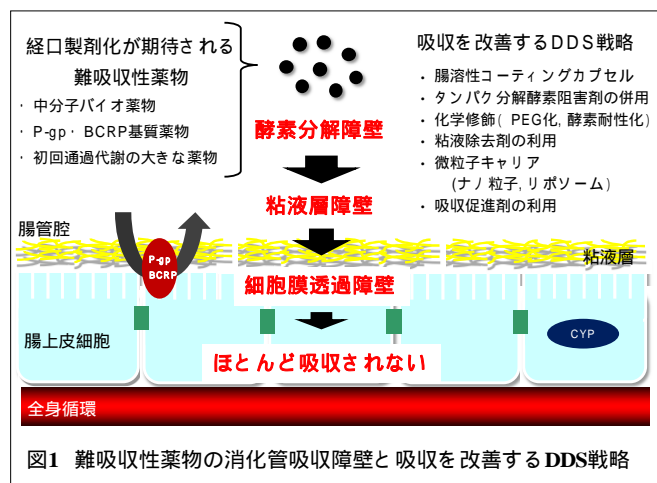
研究分野：薬剤学、薬物送達システム

キーワード：消化管吸収 経口吸収予測 生体膜透過性 iPS細胞由来小腸上皮細胞 Caco-2細胞 バイオ薬物 インスリン 吸収促進剤

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

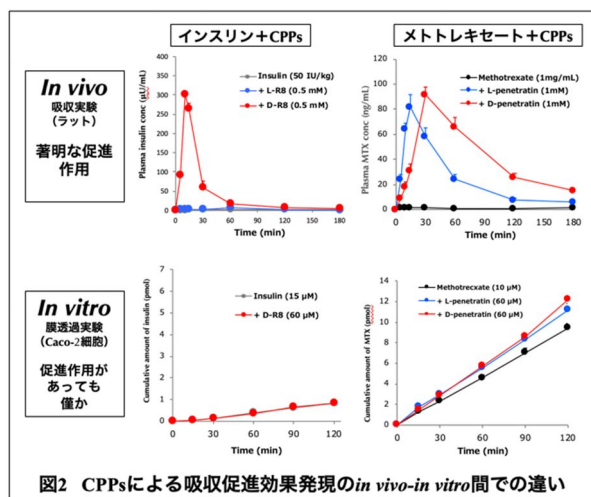
経口用の医薬品の開発段階において、ヒト小腸吸収性予測により候補化合物のバイオアベイラビリティ(BA)を知ることは大変重要である。予測されるBAが低かった場合、その理由に応じて開発の方向性が全く異なってくるからである。ヒト小腸吸収性予測には、ヒト結腸がん由来のCaco-2細胞、ヒト単離肝細胞、あるいはヒト肝・腸マイクロソームなどが従来用いられてきた。適度な脂溶性を有する分子量500以下の低分子化合物の場合は、Caco-2細胞単層膜で得られた膜透過性とヒト消化管吸収率との間に良好な相関が得られるため、Caco-2細胞の利用性が高い。



一方、近年の医薬品市場は、メディシナルケミストリーを中心とした従来の創薬研究開発から、ペプチド、タンパク質や核酸医薬などのバイオ医薬品へと大きく移行し、医薬品産業はかつてないパラダイムシフトを迎えている。特に今日では図1に示すように、バイオ薬物の中でも、経口製剤化が期待できるサイズ：分子量500-2,000程度の中分子バイオ薬物の創薬が大変注目されている。さらに、難吸収性薬物の経口製剤化を目指したDDS戦略(剤形および分子修飾、吸収促進剤や微粒子キャリア)も高機能化してきている。そのため、これら次世代化合物やDDS技術についても、

in vitro からヒト小腸吸収性を予測することが必須であるが、これに対応できる高精度の *in vitro* 予測モデルはこれまでのところ確立されていない。

Caco-2細胞は、ヒト小腸とは構造のみならず機能的な面においても大きく異なっており、小腸に存在する種々の薬物代謝酵素、トランスポーター、エンドサイトーシス活性、受容体あるいはM細胞の発現量が著しく低いか、あるいは欠損している。そのため、Caco-2細胞で得られた中分子バイオ薬物の膜透過性・細胞内在化率のデータが、ヒトにおける *in vivo* 経口吸収動態をどこまで精密に反映できているのか、現在のところ全く不明である。また、経口製剤化に活用できる様々な高機能DDS技術についても、上記の理由からCaco-2細胞単層膜透過性からヒト消化管での挙動を予測することが極めて難しい。図2に示すように、申請者らは、これまでに開発を進めているバイオ薬物吸収促進ペプチドキャリア(CPPs:細胞膜透過ペプチド)の卓越した吸収促進効果が、Caco-2細胞単層膜ではほとんど再現ができないことがわかり、この結果に衝撃を受けている。つまり現状では、バイオ薬物およびDDS技術の *in vivo* 動態および機能は、*in vitro* 細胞実験で再現することができず、*in vitro* から *in vivo* への経口BA予測や、DDS機能の作用機序解明が困難な状況にある。従って、この問題を解決するためには、小腸吸収性を精度よく予測できる新規ヒト小腸モデルの構築が急務である。このような現状の中、Caco-2細胞単層膜に代わる小腸吸収性予測モデルの候補として、ヒトiPS細胞から作製したヒト小腸細胞が注目されている。ヒトiPS細胞では、小腸にある微絨毛構造が観察されており、小腸型の腸管上皮細胞の性質を有している。さらに、医薬品の吸収と代謝に重要な役割を果たす様々な代謝酵素やトランスポーターを備えていることが確認されているため、Caco-2細胞を用いた従来法と比較して、より生体に近い代謝吸収の評価が可能となると期待される。しかしながら、iPS細胞由来腸管上皮細胞を用いた評価研究は端緒にすぎず、*in vitro-in vivo* 相関研究はほとんど報告されていない。



2. 研究の目的

上述の問題を解決するために、本研究では、高機能なDDS技術(ペプチド性吸収促進剤やナノ粒子キャリア)および中分子バイオ薬物を対象として、iPS細胞由来腸管上皮細胞を用いて *in vitro* 消化管吸収特性と *in vivo* 吸収動態との関連性を評価することを最終的な目標とし、まず最

初の段階として、中分子薬の腸管吸収を予測するツールとしての iPS 細胞由来腸管上皮細胞 (hiPSC-SIEC) の有用性を Caco-2 細胞と比較することで評価した。

3. 研究の方法

hiPSC-SIEC および Caco-2 細胞における細胞内輸送実験

hiPSC-SIEC を 37°C で解凍し、Matrigel でコーティングした 24 ウェル細胞培養インサートの頂端側に 1.0×10^5 細胞/ウェルの密度で播種し、透過実験まで 9 日間増殖させた。Caco-2 細胞は、24 ウェル細胞培養インサートの頂端側に 2.5×10^4 細胞/ウェルの密度で播種し、透過実験まで 21 日間増殖させた。どちらの細胞培養システムでも、培地は 2 日ごとに交換した。各ウェルは、孔径 0.4 μm 、培養面積 0.3 cm^2 のポリエチレンテレフタレート膜で分離された apical (top) と basal (bottom) chamber から構成されている。

細胞膜透過実験では、apical 輸送緩衝液(HBSS(+)) or HBSS(-) containing 0.001% MC, w/v and 10 mM MES; pH 6.0)または basal 輸送緩衝液(HBSS± containing 0.001 % MC, w/v and 10 mM HEPES; pH 7.4)をそれぞれ apical と basal chamber で使用した。実験開始時は、細胞培養インサート内の細胞を輸送緩衝液 (apical chamber、250 μL ; basal chamber、800 μL) で 60 分間平衡化した。60 分間のプレインキュベーション後、各ウェルの単層の経上皮/経内皮電気抵抗 (TEER) を初期値として測定した。その後、apical chamber 内の輸送緩衝液を、apical 輸送緩衝液中に FD-4 (0.7 mg/mL)、インスリン (1.5 μM) または GLP-1 (1.5 μM) を含む 250 μL の試験溶液と交換して透過実験を開始した (37°C)。一定時間の後、80 μL を basal chamber から採取し、等量の新鮮な apical 輸送緩衝液を basal chamber に加えて、インスリン、GLP-1 または FD-4 の透過量を測定した。アッセイの最後に、細胞を 500 μL の氷冷ヘパリン-HBSS (0.5 mg/mL) で 3 回洗浄して、細胞表面に結合した化合物を除去した。細胞を 150 μL の氷冷 RIPA 緩衝液で溶解した。次に、細胞溶解物を 4°C、14,000 $\times g$ で 15 分間遠心分離し、上清を使用して細胞内に取り込まれたインスリン、GLP-1 または FD-4 の量を測定した。輸送緩衝液またはライセート上清のサンプル中のインスリンおよび GLP-1 濃度は、ヒトインスリン ELISA キットおよび GLP-1 ELISA キットを使用して測定した。輸送緩衝液のサンプル中の FD-4 の濃度は、Synergy HT マイクロプレートリーダーを使用して、それぞれ 485 nm と 528 nm の励起波長と発光波長で測定した。ライセート上清サンプルのタンパク質濃度は、BCA タンパク質アッセイ試薬を使用して測定した。

TEER 測定

HiPSC-SIEC および Caco-2 細胞単層の TEER を測定し、Millicell ERS-2 を使用して細胞培養インサートフィルター上での細胞の増殖と分化を確認した。単層の TEER を 120 分間のインキュベーション期間の前後に測定し、tight junction の integrity を評価した。

統計解析

データ解析は GraphPad Prism ver. を用いて実施した。二元配置分散分析を使用して複数のグループを比較した。結果は平均値 \pm 標準偏差として表し、 $p < 0.05$ を有意であるとされた。

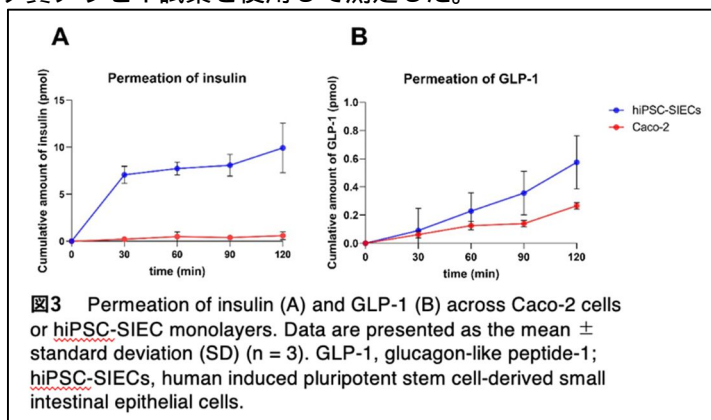


図3 Permeation of insulin (A) and GLP-1 (B) across Caco-2 cells or hiPSC-SIEC monolayers. Data are presented as the mean \pm standard deviation (SD) (n = 3). GLP-1, glucagon-like peptide-1; hiPSC-SIECs, human induced pluripotent stem cell-derived small intestinal epithelial cells.

4. 研究成果

中分子ペプチド薬物の細胞膜透過性

モデル中分子ペプチド薬物としてインスリン (分子量: 5.8 kDa) と GLP-1 (分子量: 3.3 kDa) を用いて単層膜透過実験を実施した。TEER 値は Caco-2 細胞と hiPSC-SIEC の両方において、アッセイの前後で有意に変化しなかったことから、これら 2 つのペプチド薬物が、両方の細胞型のバリアの integrity を破壊することなく、経細胞経路を介して透過したと考えられた。図 3 A および 3 B は、それぞれ Caco-2 細胞および hiPSC-SIEC 単層膜におけるインスリンおよび GLP-1 透過の時間経過を示す。注目すべきことに、hiPSC-SIEC は Caco-2 細胞よりもインスリンと GLP-1 の両方の透過が速く、hiPSC-SIEC における経細胞輸送活性が Caco-2 細胞よりも大きいことが示唆された。この仮説は、細胞内でのペプチド薬物の取り込みに関するデータによっても裏付けられた。hiPSC-SIEC におけるペプチド薬物の経細胞輸送は Caco-2 細胞よりも速かったが、薬物の取り込みはこれらの細胞間で同等であった。hiPSC-SIEC に取り込まれた薬物は、輸送活性がより高く、より短い期間で基底腔に放出されることが示唆された。細胞培養インサート上で分化した細胞のタンパク質量の違いは、hiPSC-SIEC がより薄いことを示しており、これが急速な透過挙動の理由である可能性も考えられる。経細胞輸送評価に hiPSC-SIEC を使用する場合、この特徴を注意深く考慮する必要がある。ペプチド薬物の吸収経路と考えられるトランスサイトosis など、hiPSC-SIEC における活性な経細胞経路を解明するには追加の分析が必要であると考えられる。

hiPSC-SIEC の膜バリアの完全性

上記のように、hiPSC-SIEC と Caco-2 細胞の薬物輸送活性が異なっていたことから、hiPSC-SIEC の基本的な特徴をさらに解明するために、親水性高分子化合物である FD-4 を細胞間隙マーカーとして使用して、輸送アッセイを実行し、hiPSC-SIEC の密着結合の integrity を調査した。密着結合を開く透過促進剤としてカプリン酸ナトリウム (C10) を用い、細胞に適用し FD-4 と共にインキュベートした。この場合、カルシウム沈殿物の形成を避けるために、HBSS (-) ベースの輸送緩衝液を使用した。輸送アッセイ開始 120 分後、HBSS (-) ベースの緩衝液でインキュベートした hiPSC-SIEC は、HBSS (+) ベースの緩衝液でインキュベートした細胞と比較して、TEER 値の著明な低下が認められた。一方、Caco-2 細胞は、HBSS(-) ベースの緩衝液中で安定した TEER 値を維持した (図 4A)。図 4B に示すように、C10 の透過促進効果は、HBSS(-) ベースの緩衝液でインキュベートした Caco-2 細胞で観察され、過去の論文と一致した¹⁾。対照的に、HBSS(+) でインキュベートした細胞と比較した場合、HBSS(-) ベースの緩衝液でインキュベートした hiPSC-SIEC では、C10 の非存在下でも、basal 側への FD-4 輸送の顕著な増加が観察された (図 4C)。FD-4 輸送は、HBSS(+) ベースの緩衝液でインキュベートした細胞では観察されなかった。これは、hiPSC-SIEC が二価カチオンの細胞外濃度の影響を受けやすく、バリアの integrity を維持するためにカチオンを必要とすることを示している。したがって、hiPSC-SIEC は、高分子の細胞間隙透過や C10 などの典型的な細胞間隙透過促進剤の効果の分析には適していないことが明らかとなった。

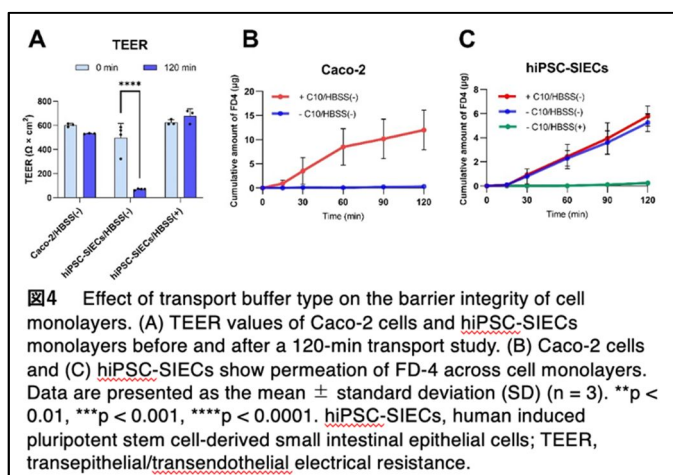


図4 Effect of transport buffer type on the barrier integrity of cell monolayers. (A) TEER values of Caco-2 cells and hiPSC-SIECs monolayers before and after a 120-min transport study. (B) Caco-2 cells and (C) hiPSC-SIECs show permeation of FD-4 across cell monolayers. Data are presented as the mean \pm standard deviation (SD) (n = 3). **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001. hiPSC-SIECs, human induced pluripotent stem cell-derived small intestinal epithelial cells; TEER, transepithelial/transendothelial electrical resistance.

細胞膜透過ペプチドCPPの機能を解析するための hiPSC-SIEC の基本機能

次に、hiPSC-SIEC の TEER 値に対する CPP の影響を測定することで、バリアの integrity に影響を与えることなく、これらの細胞を CPP の機能評価に使用できるかどうかを検討した。CPP はアミノ酸数が 30 未満のカチオン性または両親媒性ペプチドで

あり、アルギニンやリジンなどの塩基性残基が豊富に含有されている²⁾。さらに、ほとんどの CPP はエネルギー依存性のエンドサイトーシスを介して細胞内に取り込まれる³⁾。このことは、CPP が細胞単層膜を透過する経路は細胞内輸送であることを示している。細胞単層膜における経細胞輸送を正確に評価するには、バリアの integrity を維持することが必要である。CPP は一般に非侵襲性の吸収促進剤とみなされてはいるものの⁴⁾、吸収促進活性発現にバリア破壊のリスクが伴うことが良くある。図 5A および 5B に示すように、Caco-2 細胞と hiPSC-SIEC の両方で TEER 値が増加した。これは、Caco-2 細胞を使用した以前の研究と一致した¹⁾。L-ペネトラチン (60 μM) で処理した後、hiPSC-SIEC のみが TEER 値の有意な減少を示した。つまり、hiPSC-SIEC の tight junction の integrity は、Caco-2 細胞よりも実験環境の影響を受けやすく、L-ペネトラチンの添加によって破壊される可能性があるが、Caco-2 細胞には影響を与えなかった。Caco-2 細胞と hiPSC-SIEC は密着結合形成などの類似点があるが、本研究の結果から、Caco-2 細胞に対して確立された実験条件が hiPSC-SIEC にそのまま適用することはできないことが明らかとなった。hiPSC-SIEC を使用して CPP の吸収促進効果を評価するには、実験条件のさらなる最適化が必要である。

結論

本研究では、中分子薬物の輸送を決定するための *in vitro* モデルの候補として、hiPSC-SIEC の基本的特性と最適な実験条件を明らかにすることを目的とした。二価カチオンの細胞外濃度は、hiPSC-SIEC のバリアの integrity に大きく影響し、カチオンがないと細胞は安定した TEER 値を維持できないことが明らかとなった。L-ペネトラチンは、hiPSC-SIEC の

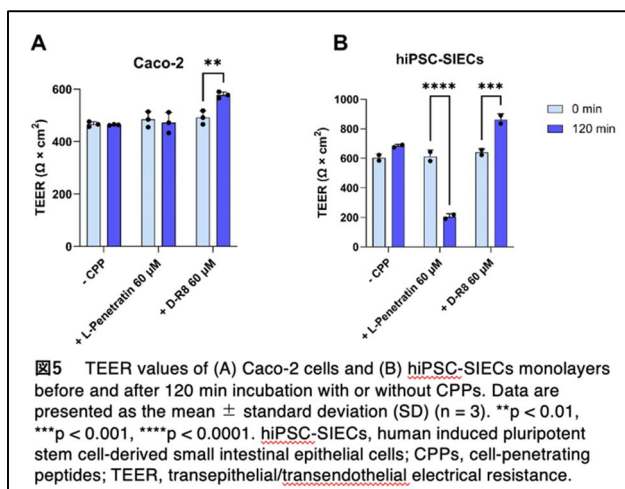


図5 TEER values of (A) Caco-2 cells and (B) hiPSC-SIECs monolayers before and after 120 min incubation with or without CPPs. Data are presented as the mean \pm standard deviation (SD) (n = 3). **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001. hiPSC-SIECs, human induced pluripotent stem cell-derived small intestinal epithelial cells; CPPs, cell-penetrating peptides; TEER, transepithelial/transendothelial electrical resistance.

TEER 値を大幅に低下させる可能性があり、hiPSC-SIEC が Caco-2 細胞よりも細胞外環境に対して感受性が高いという仮説を裏付ける結果となった。さらに、hiPSC-SIEC ではトランスサイトシスが高度に活性化されており、経細胞薬物輸送を評価するための *in vitro* モデルを確立する上で重要な要素であることが示唆された。我々のデータは、hiPSC-SIEC は、広く使用されている Caco-2 細胞と基本的性質が大きく異なる可能性があることを明らかにした。したがって、ペプチド薬物輸送や吸収促進剤の効果・機構を高精度に解析するための新たな *in vitro* 評価モデルを確立するには、hiPSC-SIEC の特徴をさらに解明することが不可欠であると結論できる。

参考文献

1. Kamei N, Kawano S, Abe R, Hirano S, Ogino H, Tamiwa H, Takeda-Morishita M. Effects of intestinal luminal contents and the importance of microfold cells on the ability of cell-penetrating peptides to enhance epithelial permeation of insulin. *Eur J Pharm Biopharm* 2020; 155:77–87.
2. Kristensen M, Nielsen HM. Cell-Penetrating Peptides as Carriers for Oral Delivery of Biopharmaceuticals. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2016; 118(1):99-106.
3. Kim GC, Cheon DH, Lee Y. Challenge to overcome current limitations of cell-penetrating peptides. *Biochim Biophys Acta Protein Proteom* 2021; 1869(4):140604.
4. Zhang D, Wang J, Xu D. Cell-penetrating peptides as noninvasive transmembrane vectors for the development of novel multifunctional drug-delivery systems. *J Control Release* 2016; 229:130–139.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Itagaki M, Kamei N, Takeda-Morishita M	4. 巻 -
2. 論文標題 Evaluation of function and features of human induced pluripotent stem cell-derived small intestinal epithelial cells for analyzing peptide drug intestinal absorption profiles	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Pharmaceutical Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xphs.2023.05.013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 武田真莉子、亀井敬泰
2. 発表標題 難吸収性中分子医薬の消化管吸収改善とin vitroからの予測性
3. 学会等名 日本薬剤学会 第36年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武田真莉子
2. 発表標題 近未来の糖尿病治療 ～新しい治療戦略への期待～
3. 学会等名 第9回 日本くすりと糖尿病学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武田真莉子
2. 発表標題 DDSが創る・支える糖尿病治療の近未来モダリティ
3. 学会等名 第57回インスリン研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 板垣 舞、杉山 千晶、西井 恵、亀井 優海、中瀬 生彦、武田 真莉子、亀井 敬泰
2. 発表標題 各種阻害剤およびsiRNAを用いたエンドサイトーシス評価系の再構築
3. 学会等名 日本薬剤学会 第37年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	亀井 敬泰 (Kamei Noriyasu) (40637451)	神戸学院大学・薬学部・講師 (34509)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------